نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۴۵-۶۳۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 631-645

**مقاله پژوهشی**

# تجزیه و تحلیل متاژنومیکس جمعیت میکروبی در یک پنیر محلی ایرانی

**نفیسه دعوتی[1]*- سحر بهرامی[2]**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۲

## چکیده

در این مطالعه، یک پنیر محلی از شیر گاو براساس دستورالعمل محلی تهیه گردید. جمعیت میکروبی پنیر و توانایی عملکردی آن برای رسیدگی توسط توالی‌یابی کامل متاژنوم بررسی گردید. پنیر سنتی به‌وسیله کشت آغازگر مزوفیلیک تولید شد. پنیر در دمای ۱۰°C به مدت ۳ ماه دوره رسیدگی خود را طی کرد. نمونه‌ها از سطح پنیر جمع آوری گردید. بعد از خالص‌سازی کلنی‌ها، جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی از لحاظ فنوتیپی در سطح جنس توسط تست‌های فیزیولوژی شامل قابلیت تولید گاز، رشد در pHهای مختلف (۹/۶ و ۴/۴)، تحمل نمک (۶/۵ و ۱۸ درصد) و دماهای مختلف (۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) شناسایی شدند. نتایج شناسایی فنوتیپی نشان داد که اکثر سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک متعلق به Streptococcus, Lactococcus و Lactobacillus بودند. همچنین نتایج آنالیز متاژنومیکس نشان داد که جنس‌های متعددی شامل Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Acinetobacter, Enterococcus Glutamicibacter, و Weissella در پنیر وجود دارند. *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus helveticus* به‌عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند. باکتری‌های بیماری‌زا نظیر Enterobacter, Listeria و Staphylococcus نیز به مقدار جزئی یافت شدند و بنابراین تقریبا نگرانی برای مصرف‌کنندگان و سلامت انسان وجود ندارد. میکروبیوم این پنیر، توانایی عملکردی برای سنتز رنج وسیعی از ترکیبات بو و مرتبط با توسعه طعم در این محصول را نشان داد که با متابولیسم و بیوسنتز متان، اسیدهای آمینه شاخه‌دار (ایزولوسین، والین، لوسین)، اسیدهای آمینه آروماتیک (تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین)، سایر اسیدهای آمینه (ال-لیزین، بتا-آلانین)، اسیدهای چرب (آراشیدونات، پالمیتات، استئارات) و مونوساکاریدها در ارتباط بود. آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز و متابولیسم اسیدهای آمینه درطی رسیدگی این پنیر یافت شدند. این آنزیم‌ها شامل 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase, 2-isopropylmalate synthase, 3-dehydroquinate dehydratase, 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. بودند. براساس نتایج KAAS (سرور حاشیه نویسی اتوماتیک KEGG)، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی جامعه میکروبی روی سطح پنیر سنتی شامل موارد زیر بودند: Cytochrome P450 Photosynthesis Proteins, Peptidases & Inhibitors, Glycosyltransferases, Lipopolysaccharide Biosynthesis Proteins, Peptidoglycan Biosynthesis and Degradation Proteins, Lipid Biosynthesis Proteins, Protein Kinases, Polyketide Biosynthesis Proteins Prenyltransferases, Protein Phosphatases & Associated Proteins, and Amino Acid Related Enzymes. پنیر تحت مطالعه به‌عنوان یک غذای عملگر، فواید سلامتی برای مصرف‌کنندگان به‌واسطه حضور باکتری‌های پروبیوتیک و ژن‌های مرتبط با بیوسنتز ترکیبات با ارزش شامل آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و آنتی‌اکسیدان‌ها را نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** پنیر، متاژنومیکس، طعم، باکتری اسید لاکتیک.

## مقدمه

رسیدگی پنیر جهت بهبود طعم و بافت شامل یک سری تغییرات پیچیده میکروبی و بیوشیمیایی است و میکروبیوم پنیر، یکی از فاکتورهای مهم در رسیدگی پنیر و تشکیل طعم است. میکروبیوم به معنای زیست‌بوم میکروارگانیسم‌ها نظیر میکروبیوم دستگاه گوارش انسان است و همه ژن‌ها و توده سلولی میکروارگانیسم‌های مستقر در یک بخش ویژه را گویند. توسعه طعم پنیر یکی ازفرایندهای بیوشیمیایی پیچیده و دینامیکی است که شرایط محیطی نظیر دمای پخت (بسته به نوع فرایند)، زمان و دمای رسیدگی روی ترکیب میکروبی و فعالیت متابولیکی آن موثر است (Ben Lawlor *et al.*, 2003). طعم پنیر تاثیر مهمی روی مقبولیت محصول و رضایت مصرف کننده دارد (Liggett *et al.*, 2008). بنابراین توسعه طعم مطلوب برای صنعت پنیرسازی

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: n.davati@basu.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v17i4.87933

مهم است و مطالعات متعددی برای درک بهتر تشکیل طعم پنیرهای مختلف انجام شده است (Murtaza *et al.*, 2014; Smit *et al.*, 2005). کشت‌های آغازگراصولا مسئول تولید سریع اسید به‌واسطه تخمیر قند موجود در پنیر، تولید پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد از کازئین و در نتیجه توسعه طعم نهایی پنیر می‌باشند. به‌عنوان مثال توازن بین اسیدهای آمینه، پپتیدها، اسیدهای چرب آزاد و گروه‌های کربونیل ویژگی طعم شبه آجیلی و شیرین برای پنیرهای سوئیسی فراهم می‌کند (Johnson, 2014). بسته به نوع پنیر، تغییرات بیوشیمیایی گسترده منجر به تغییرات بافت، ایجاد عطر و طعم در طی رسیدگی پنیر رخ می‌دهد. عمدتا این تغییرات به سه گروه پروتئولیز و کاتابولیسم اسیدهای آمینه; لیپولیز و متابولیسم اسیدهای چرب، گلیکولیز و متابولیسم لاکتوز، لاکتات و سیترات تقسیم می‌شوند (McSweeney *et al.*, 2006). ترکیبات عطر و طعم موجود در پنیر ناشی از واکنش‌های غیرآنزیمی، عملکرد آنزیمی باکتری‌های آغازگر (منبع اصلی آنزیم‌های موجود در مسیرهای متابولیکی)، غیرآغازگر، رنت و آنزیم‌های ذاتی شیر حاصل می‌شود (Smit *et al.*, 2005). بدیهی است که عامل اصلی تخمیر لاکتوز، باکتری‌های اسید لاکتیک هستند و این باکتری‌ها قادرند بخشی از پیروات تولید شده به عنوان یک ترکیب حد واسط واکنش‌های متابولیکی را متناوبا به ترکیبات مختلف طعم دهنده مانند دی‌استیل، استون، استالدئید یا اسید استیک تبدیل کنند. لیپولیز منجر به تشکیل اسیدهای چرب آزاد می‌شود که می‌تواند پیش‌ساز ترکیبات طعم‌دهنده مانند متیل کتون‌ها، الکل‌های ثانویه، استرها و لاکتون‌ها باشد. طعم حاصل از چربی در پنیرهایی مانند کاممبرت[1] و راکوفورتی[2] از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تجزیه کازئین‌ها بدون شک مهمترین مسیر بیوشیمیایی برای تشکیل عطر و طعم در پنیرهای نیمه سخت و سخت است. تجزیه کازئین با فعالیت آنزیم‌های رنت، پپتیداز و پروتئیناز موجود در پوشش سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک موجب ایجاد پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد می‌شود (Smit *et al.*, 2005). بافت، حاصل خواص فیزیکی از جمله اندازه، شکل، تعداد، ماهیت و ترکیب عناصر سازنده است که با ترکیبی از خواص لامسه، بینایی و شنوایی درک می‌شود. خواص فیزیکی پنیر تحت تاثیر عواملی از جمله ترکیبات شیر، روش تولید و شرایط رسیدگی (زمان، دما و رطوبت نسبی) قرار دارد . به طور کلی می‌توان گفت بافت پنیر در طی رسیدن از تغییر در تعادل کلسیم موجود در پنیر، هیدرولیز ماتریس کازئین، تغییر در pH و آب اتصالی حاصل می‌شود (McSweeney *et al.*, 2006).

آغاز فرایند تخمیر پنیر با کشت آغازگر انجام می‌شود. آغازگرهای مزوفیلیک و ترموفیلیک در دمای بهینه رشد خود به‌ترتیب حدود ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد رشد می‌کنند. حضور کشت آغازگر برای شکل‌گیری طعم در پنیرهای حاصل از شیر خام به تنهایی کافی نیست و میکروفلور ذاتی ماده اولیه نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. هر محصول تخمیری بومی مختص هر منطقه دارای فلور میکروبی ذاتی است که مسئول ایجاد ویژگی‌های منحصر به فرد آن محصول از نظر طعم، آروما، بافت، رنگ و غیره می‌باشد. مثلا نتایج حاصل از پژوهش‌ها نشان داده است که لاکتوکوکوس‌های وحشی جدا شده از محصولات لبنی و غیرلبنی، طعم‌های خاص از آنچه که در سویه‌های صنعتی شناخته شده است تولید می‌کنند (Lordan *et al.*, 2019).

بنابراین جهت کنترل و مدیریت تولید صنعتی محصولات سنتی تخمیری نظیر پنیر بایستی شناخت کامل از فلور میکروبی و فرایندهای بیوشیمیایی پیچیده منجر به تولید خواص حسی منحصر به فرد آن داشته باشیم. شناسایی فلور میکروبی عمدتا پیچیده محصولات تخمیری بومی به روش‌های تشخیص فنوتیپی و مولکولی مستقل از کشت و یا وابسته به کشت انجام می‌شود. که در این میان روش‌های مولکولی در تکمیل روش‌های فنوتیپی از دقت بیشتری برخوردارند. در روش‌های تشخیص مبتنی برکشت به دلیل آنکه بخشی از فلور میکروبی قابلیت کشت بر روی محیط جامد را نداشته و کلنی مشخصی از آن برای استحصال DNA وجود ندارد بهتر است از روش‌های مستقل از کشت نظیر DGGE و متاژنومیکس[3] بهره برد. در مطالعات میکروبی، متاژنومیکس علم مطالعه محتوای ژنتیکی بر روی DNA مستقیما استخراج شده از نمونه‌های محیطی و نه از کلنی میکروارگانیسم‌های کشت یافته است. این رشته گسترده ممکن است ژنومیکس محیطی، اکونومیست یا ژنومیکس اجتماع نامیده شود. با این روش، هرگونه نمونه محیطی از اعماق اقیانوس گرفته تا لایه‌های اتمسفر می‌تواند مورد مطالعه مولکولی قرار گیرد. به‌واسطه توسعه تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی[4] (NGS) کاربرد روش‌های متاژنومیکس و متاترنسکریپتومیکس[5] در تحقیقات مرتبط با مواد غذایی پیشرفت بسیار چشمگیری داشته است (Kergourlay *et al.*, 2015). متاژنومیکس کامل ژنوم[6] به‌عنوان ابزاری مفید در تشخیص تغییرات دینامیکی جمعیت میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی پنیر بسیار سودمند عمل کرده است. اخیرا مطالعات متعدد انجام شده روی تجزیه و تحلیل متاژنومیکس پنیرهای ایتالیایی، مکزیکی، فرانسوی و بلژیکی اطلاعات

1 Camembert
2 Roqueforti
3 Metagenomic
4 Next-generation sequencing
5 Metatranscriptomic
6 Whole genome metagenomics

مفیدی از پراکنش زیستی و فعالیت‌های متابولیکی گونه‌های میکروبی این محصولات فراهم کرده است. به‌عنوان مثال Lordan و همکاران (۲۰۱۹)، در مطالعه‌ای با کمک متاژنومیکس و MS-GC، فلور میکروبی دخیل در رسیدگی پنیر حاصل از شیر بز و ژن‌های مرتبط با تولید لیپیدهای قطبی با خاصیت کاهندگی لخته خون را بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که تخمیر بر ترکیب اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای قطبی مؤثر است و موجب تقویت خواص ضد لختگی خون با مصرف این نوع پنیر می‌شود. با کمک متاژنومیکس می‌توان فلور میکروبی غالب و مسئول رسیدگی محصولات تخمیری را شناسایی کرد تا با جداسازی باکتری‌های مسئول رسیدگی از محصولات بومی، از آن‌ها بتوان در تولید صنعتی محصول استفاده کرده و از خواص تکنولوژیکی جدایه‌های میکروبی بهره برد. همچنین با شناخت مسیرهای بیوشیمیایی براساس محتوای ژنومی آن می‌توان شرایط تولید را به سمت ایجاد محصولی با کیفیت خاص تغییر داد و درک درستی از خواص دارویی، مدت ماندگاری براساس تولید ترکیبات ضدمیکروبی و ارزش تغذیه‌ای آن پیدا کرد. در این مطالعه سعی بر آن است که با تجزیه و تحلیل متاژنومیکس ژنوم کامل فلور میکروبی موجود در لایه سطحی یک پنیر سنتی، جامعه میکروبی غالب مسئول تخمیر و همچنین پتانسیل محتوای ژنومی آن در تولید طعم، بو و ترکیبات ضدمیکروبی و دارویی شناسایی شود.

## مواد و روش‌ها

ویژگی‌های شیمیایی شیر گاو شامل pH با دستگاه pHمتر، چربی (مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۶)، ماده خشک بدون چربی (مطابق با استاندارد ملـی ایـران شـماره ۶۳۷)، میزان اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک (مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲) اندازه‌گیری گردید.

### تهیه پنیر

براساس یک دستورالعمل محلی در یکی از روستاهای غرب ایران، در ابتدا شیر تازه گاو تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و تا دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید. سپس کشت آغازگر مزوفیلیک (-CHR Hansen CHN-22 culture- Denmark) به آن اضافه گردید و مخلوط شیر و آغازگر پس از هم زدن حدود ۴۰ دقیقه، در دمای پایین نگهداری شد. سپس با کفگیر روی دلمه‌ها را فشار داده تا سفت شدن بافت آن امتحان گردد. در صورت سفت شدن با چاقو دلمه‌ها برش داده شد و به مدت ۵ دقیقه دیگر به آن استراحت دادیم. بعد از همزدن دلمه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۰ دقیقه دیگر به آن استراحت دادیم تا دلمه‌ها ته‌نشین شوند. جهت خروج آب، دلمه‌ها را درون پارچه ریخته و دوباره دلمه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استراحت دادیم و سپس در پارچه‌ای ریخته تا آب‌گیری شود. دلمه آبگیری شده روی تخته‌ای برش داده شد. و با نمک خوب مخلوط گردید. سپس پارچه حاوی لخته‌های برش داده شده در ظرفی قرار داده شد و یک جسم سنگین حدود ۱۰ کیلوگرمی به مدت یک ساعت بر روی درب ظرف قرار دادیم تا پنیر منسجم شود. در مرحله بعد پنیر را داخل ظرف قالبی شکل، پشت و رو کرده و یک بار دیگر به مدت ۱۲ ساعت، جسم ۲۰ کیلوگرمی بر روی درب ظرف قرار داده شد. بعد پنیر را از داخل پارچه پنیرگیری برداشته و به مدت ۲ تا ۳ روز در جای خشک نگه داشته شد. در مرحله آخر دور تا دور آن آغشته به روغن نارگیل گردید و پارچه توری بر روی آن کشیده شد و به مدت ۳ ماه در دمای حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا پنیر دوره رسیدگی خود را طی کند. و هفته‌ای یک‌بار پنیر پشت و رو گردید.

### جداسازی باکتری‌های دخیل در فرایند رسیدگی پنیر

در پایان فرایند رسیدگی، ۱۰۰ گرم نمونه از سطوح جانبی و نزدیک به بافت سطحی پنیر با اسپاتول تحت شرایط استریل برداشت گردید و توسط هاون و دسته هاون چینی استریل خرد گردید. رقیق‌سازی نمونه در رینگر تا رقت $10^{-10}$ انجام گردید و از رقت‌های مناسب در محیط‌های MRS و M17 آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. کلیه پلیت‌های کشت یافته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در جار بی‌هوازی حاوی گازپک نوع A گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های متمایز برداشت شده و توسط کشت خطی خالص سازی گردیدند. سپس جهت بررسی جنس‌های مشکوک به باکتری‌های اسید لاکتیک، جدایه‌های باکتریایی حاصل از MRS و M17 که کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند انتخاب شدند (Harrigan, 1998).

### شناسایی فنوتیپی جدایه‌ها در سطح جنس

جهت تشخیص جدایه‌ها تا سطح جنس توسط آزمون‌های بیوشیمیایی شامل بررسی توانایی رشد در دو دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، pH= ۴/۴ و pH= ۹/۶، کلرید سدیم با غلظت ۶/۵ و ۱۸ درصد و قابلیت تولید گاز دی‌اکسید کربن از محیط MRS براث اصلاح شده (Lahtinen *et al.*, 2011) و جهت بررسی هیدرولیز آرژنین از محیط ردی براث[1] استفاده گردید (Cardinal *et al.*, 1997).

### استخراج DNA و تهیه کتابخانه ژنومی

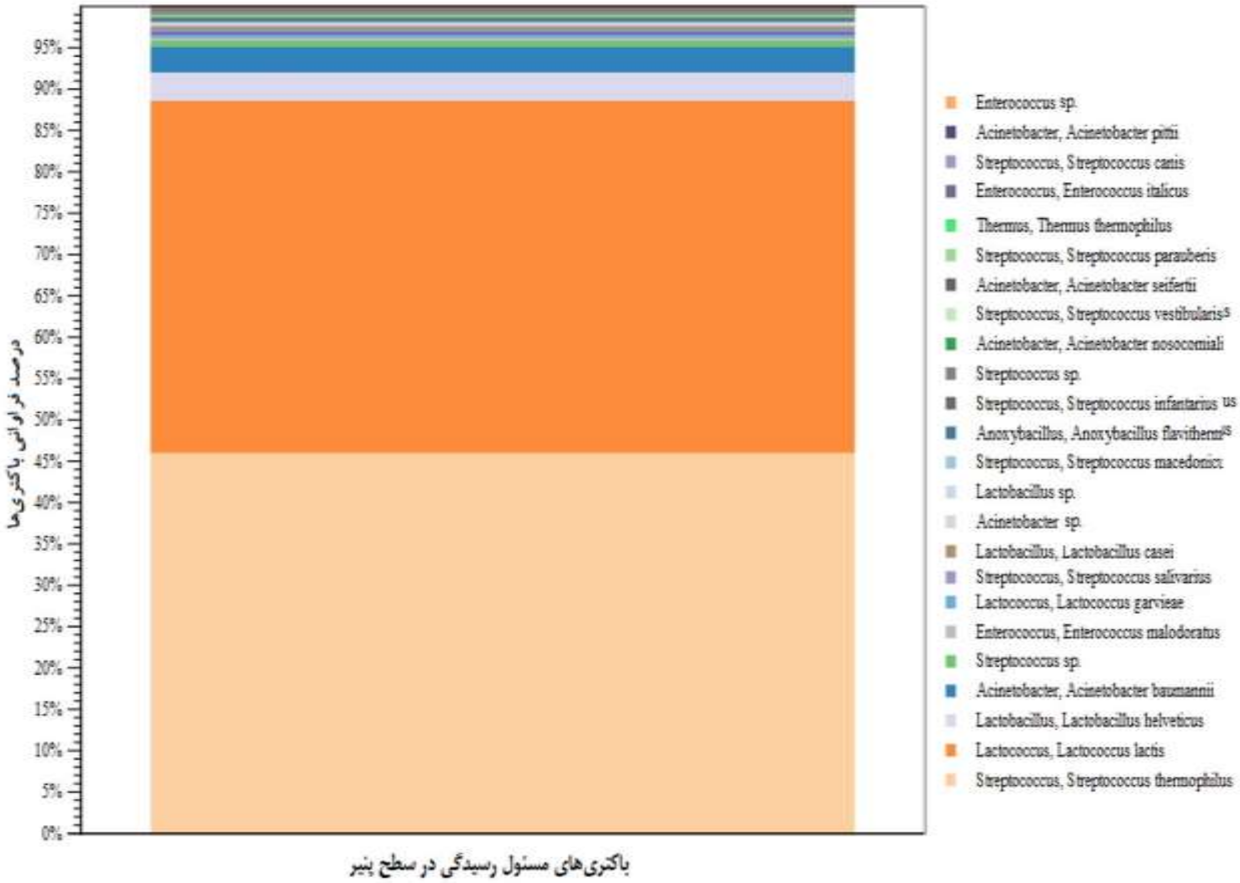
استخراج DNA از پنیر توسـط کیـت DNeasy®Blood & Tissue Kit براساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گردید. کتابخانه متاژنومی توسط کیت تهیه کتابخانه Nextera™

1 Reddy broth

DNA شرکت ایلومینا ساخته شد و براساس پلتفورم HiSeq® 2000 و خوانش‌های دو طرفه 2×100 bp توالی یابی گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری و متاژنومیکس داده‌ها

داده‌های خام از نظر تعیین ترکیب جامعه میکروبی توسط Taxonomic Profiling و پتانسیل عملکردی که در کل ژنوم جامعه میکروبی پنیررمزگذاری شده بود توسط De Novo Assemble Metagenome و متعاقب آن Bin Pangenomes by Sequence پردازش شد. پروفایل تاکسونومیک و پتانسیل‌های متابولیک موجود در جامعه میکروبی پنیر به صورت نمودار پای تهیه‌گردید. تمام تجزیه و تحلیل داده‌ها و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار CLC genomics 2019 انجام گردید. مسیرهای متابولیکی در بیوسنتز ترکیبات آلی توسط سایت KEGG (https://www.genome.jp/kegg) و سرور KAAS (https://www.genome.jp/kegg/kaas) بدست آمد. اثر زمان تخمیر بر روی تعداد جنس‌های شناسایی شده به روش فنوتیپی در فواصل زمانی ۵ روز با نرم‌افزار SPSS version 16 و تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر بررسی شد و معنی‌داری در سطح $p<0.05$ بررسی گردید.




**شکل ۱- جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی مسئول رسیدگی سطحی پنیر شناسایی شده بر پایه NGS**

## نتایج و بحث

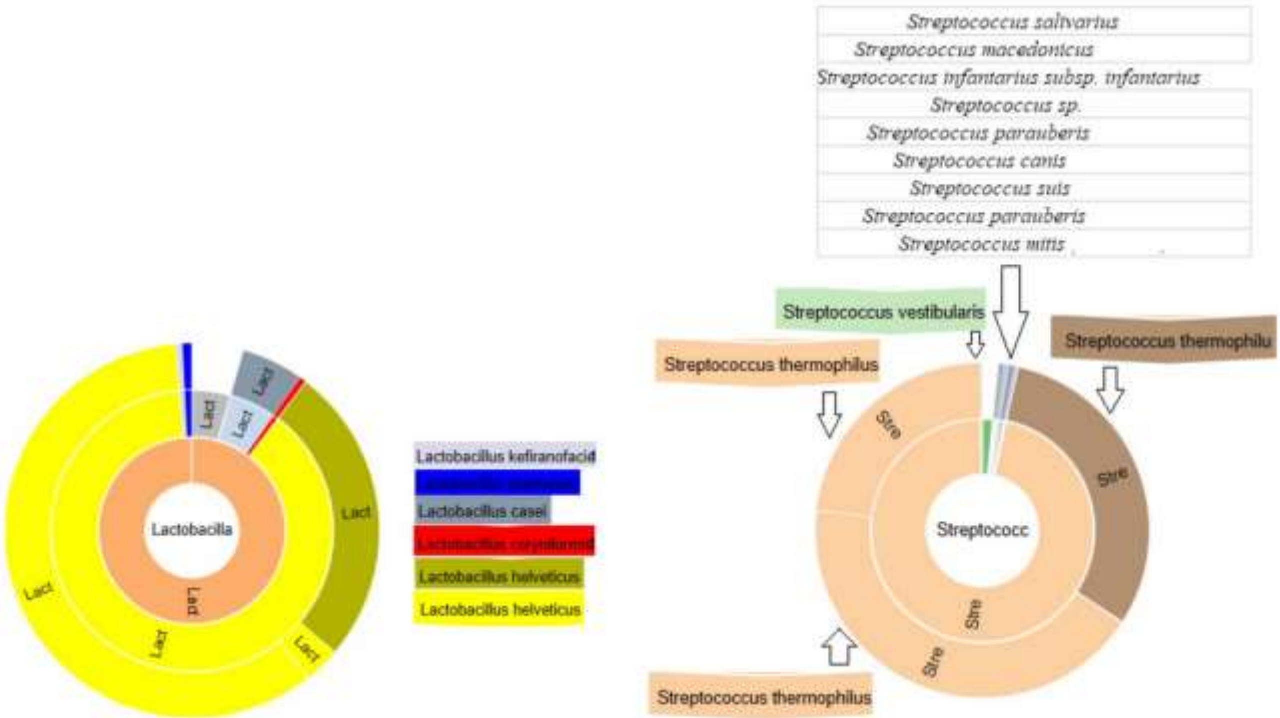
براساس نتایج اندازه‌گیری، ویژگی‌های شیمیایی شیر گاو شامل چربی ۳٪، ماده خشک بدون چربی شیر ۸/۵٪، میزان اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک ۰/۱۵٪ و H شیر ۶/۷ بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری بر روی ۸۵ جدایه لاکتیکی شناسایی شده به روش فنوتیپی از سطح پنیر در فواصل زمانی ۵ روز نشان داد که تقریبا در تمام مراحل تخمیر جنس‌های شناسایی شده فلور غالب را تشکیل داده است و زمان تخمیر اثر معنی‌داری بر روی تعداد آن‌ها نداشت به‌طوریکه براساس این شناسایی فنوتیپی در آخرین محله تخمیر جنس‌های Streptococcus ۵۵٪، Lactococcus ۴۰٪ و Lactobacillus ۲٪ فلور غالب جامعه باکتریایی این بخش سطحی را تشکیل دادند. همچنین نتایج تشخیص مولکولی براساس نسل جدید توالی‌یابی جنس‌های غالب در سطح پنیر را به شرح زیر نشان داد. Streptococcus ۴۸/۲۴٪، Lactococcus ۴۳٪، Lactobacillus ۳/۴۷٪، Enterococcus ۰/۵٪ و leuconostoc ۰/۰۲٪.

بنابراین نتایج تشخیص مولکولی و فنوتیپی هر دو نشان دادند که Streptococcus و Lactococcus به‌ترتیب دو جنس غالب در رسیدگی در سطح پنیر هستند. همچنین نتایج تشخیص مولکولی براساس NGS (شکل ۱ و ۲) نشان داد که باکتری‌های شرکت کننده در رسیدگی سطحی پنیر شامل گونه‌های زیر بودند:

*Streptococcus thermophilus, L. lactis, Lactobacillus helveticus, Acinetobacter baumannii, Enterococcus malodoratus, Lactococcus garvieae, Streptococcus salivarius, Lactobacillus casei, Streptococcus macedonicus, Anoxybacillus flavithermus, Streptococcus infantarius, Acinetobacter nosocomialis, Streptococcus vestibularis, Acinetobacter seifertii, Streptococcus parauberis, Thermus thermophilus, Enterococcus italicus, Streptococcus canis, Acinetobacter pittii, Glutamicibacter arilaitensis, Geobacillus stearothermophilus, Enterococcus faecalis, Lactobacillus plantarum, Acinetobacter lwoffii, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus kefiranofaciens, Streptococcus suis, Weissella paramesenteroides, Streptococcus mitis.*

برای نمایش بهتر نتایج به دلیل تنوع زیاد گونه‌های باکتریایی متعلق به دو جنس Streptococcus و Lactobacillus این گونه‌ها در شکل ۲ به صورت نمودار پای نشان داده می‌شوند.

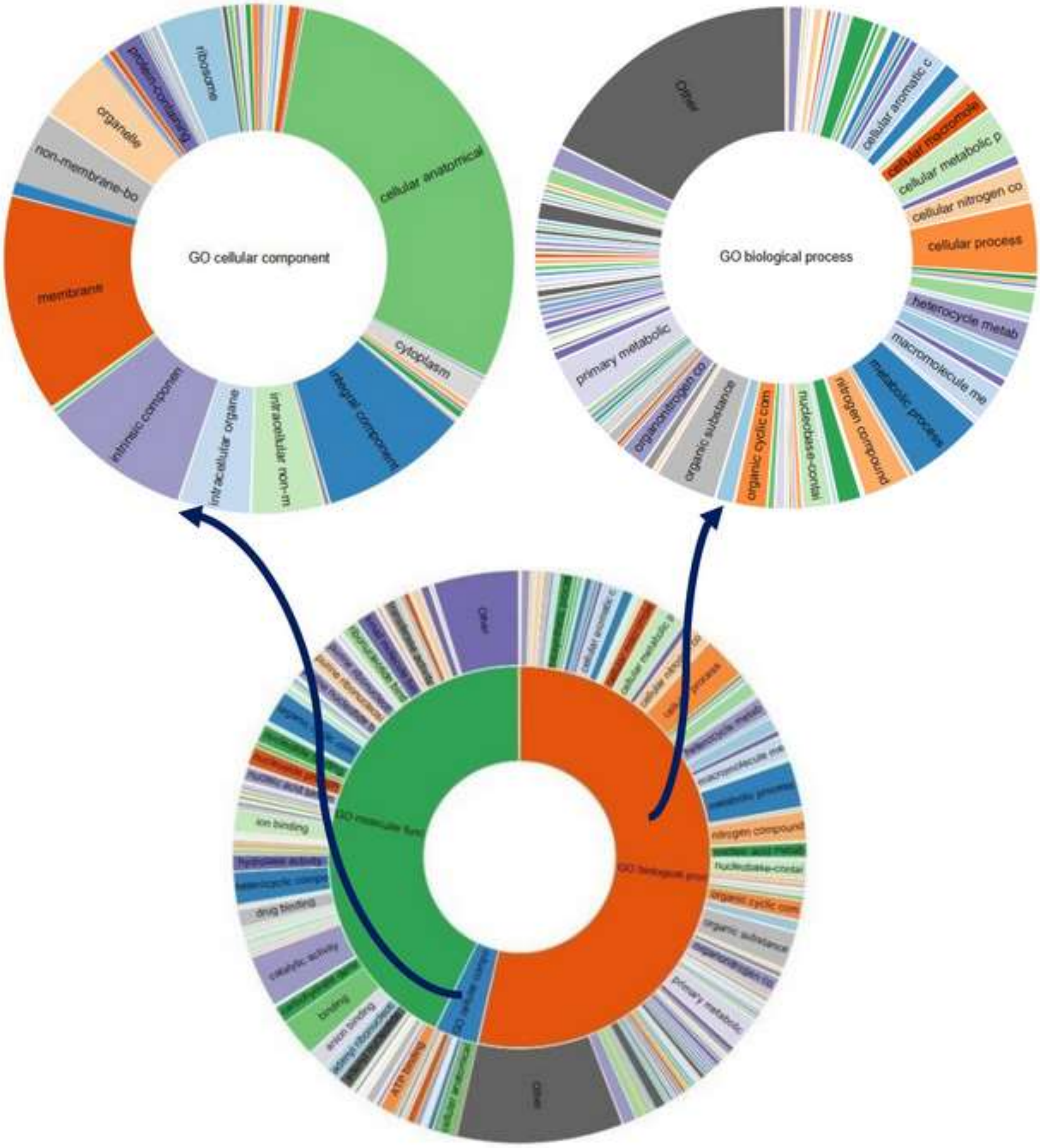
از آنجایی‌که طرز تهیه این پنیر سنتی مشابه چدار است نتایج آن را با مطالعات مشابه انجام شده بر روی پنیر چدار مقایسه می‌کنیم. Fitzsimons و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه‌ای که بر روی شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی وابسته به کشت باکتری‌های اسید لاکتیک غیرآغازگر[1] در طی رسیدگی پنیر چدار داشتند موفق شدند باکتری‌های زیر را شناسایی کنند. ۲/۱٪ *L. plantarum* ۹۶/۴٪ *Lactobacillus paracasei*، ۰/۳٪ *Lactobacillus brevis* و ۰/۳٪ *Lactobacillus curvatus*.




**شکل ۲- گونه‌های استرپتوکوکسی و لاکتوباسیلوسی غالب در رسیدگی پنیر**

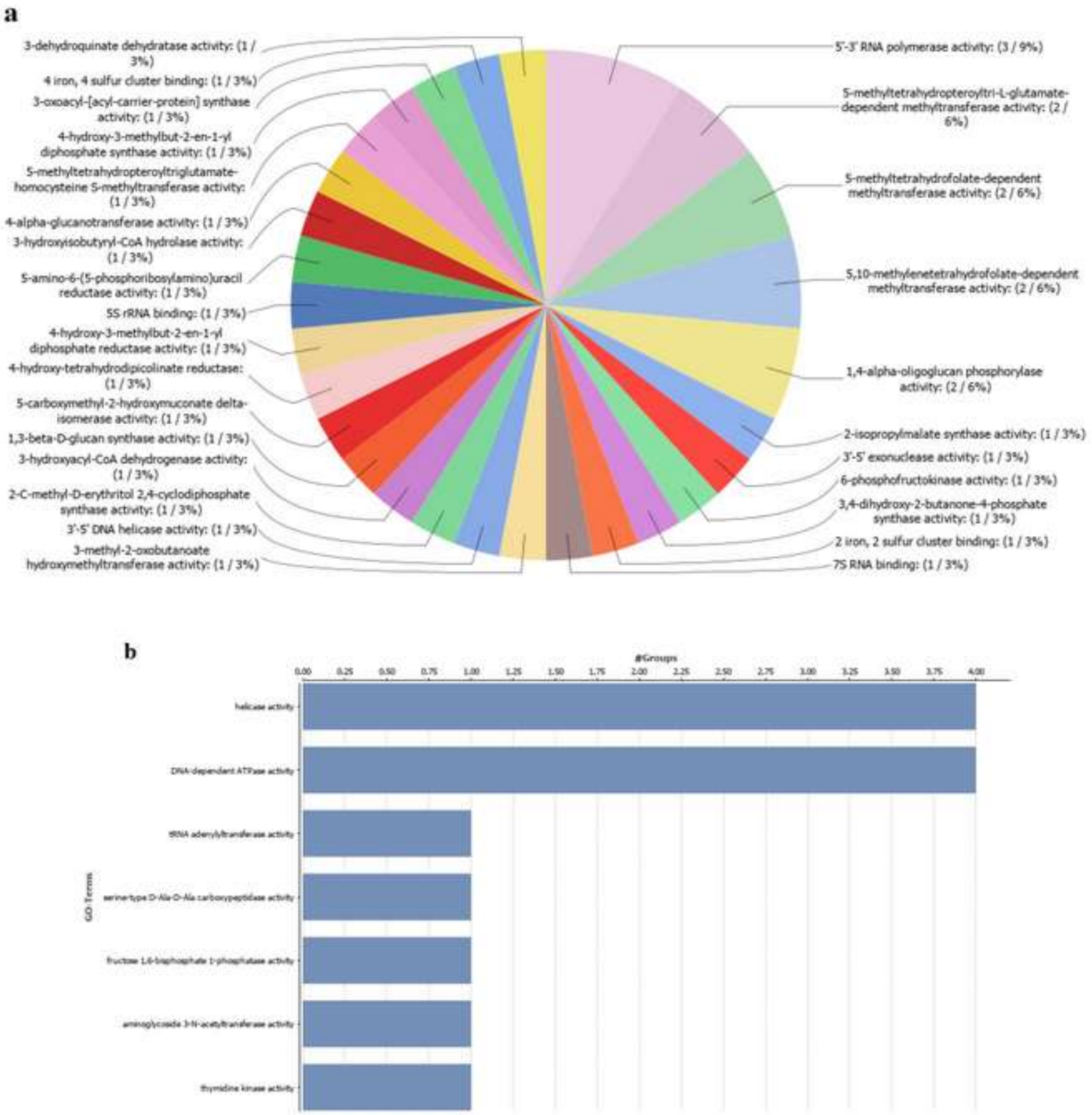
Broadbent و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی فلور میکروبی پنیر چدار حاصل از درصدهای چربی مختلف که با کشت آغازگر *L. lactis* تهیه شده بود را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که فلور میکروبی تام پنیر مرتبط با تغییر میزان چربی پنیر تغییر می‌کند اما فلور میکروبی غالب مستقل بوده و تغییر نمی‌کند. Swearingen و همکاران (۲۰۰۱) در طی شناسایی فلور میکروبی غیر آغازگر و بررسی تاثیر آن بر کیفیت پنیر چدار نشان دادند که در بین ۷۵ جدایه باکتری، Lactobacillus ۶۴٪، *S. thermophilus* ۳۲٪ و Lactococcus۴٪ فلور میکروبی غالب را تشکیل می‌دهند. آن‌ها یافتند که فلور میکروبی غیرآغازگر نقش مهمی در توسعه طعم ایفاء می‌کند.

1 Non-Starter Lactic Acid Bacteria




**شکل ۳- نگاشت GO IDهای حاصل از تجزیه و تحلیل متاژنوم داده‌ها: ترکیبات سلولی، عملکرد مولکولی و فرایند بیولوژیکی**

Ganesan و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که جمعیت لاکتوکوکسی و لاکتوباسیلوسی غیرآغازگری و همچنین بیفیدوباکتری‌هایی که دستی به پنیر چدار افزوده شده بود در سرتاسر فرایند تولید پنیر و فرایند رسیدگی بقاء دارند و افزودن پروبیوتیک‌ها در سطوح پایین‌تر بقاء باکتری‌های آغازگر و غیرآغازگر را تحت تاثیر می‌دهد. براساس نتایج متاژنومیکس جنس‌های Staphylococcus، listeria و خانواده Enterococcaceae در این پنیر سنتی وجود دارد که نشان‌دهنده انتقال آلودگی در طی تولید و رسیدگی پنیر بوده است اما از آنجاییکه فلور میکروبی لاکتیکی غالب بوده است به دلیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی نظیر اسیدهای آلی، آب اکسیژنه، دی اکسیدکربن، استالدئید، استوئین، الکل‌ها و باکتریوسین‌ها و همچنین pH پایین رشد این باکتری‌های پاتوژن محدود شده و هیچگونه خطری برای مصرف کننده نخواهد داشت. همچنین باکتری‌های پروبیوتیک نظیر *L. plantarum, L. helveticus, L. lactis, S. thermophilus, kefiranofaciens,* و *L. casei* که قبلا تاثیرات مثبت آن در سلامت بدن ثابت شده است نیز در این پنیر شناسایی گردید که نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای و خواص سلامتی بخش این محصول به عنوان یک محصول پروبیوتیک است.




**شکل ٤- بیشترین پتانسیل عملکردهای آنزیمی در سطوح دو (a) و نه (b) موجود در محتوای ژنومی جامعه میکروبی مسئول رسیدگی پنیر**

براساس تجزیه و تحلیل متاژنوم داده‌ها، نگاشت[1] کدهای حاصل از هستی شناسی GO ID[2] مسیرهای بیولوژیکی را به سه گروه شامل ترکیبات سلولی، عملکرد مولکولی و فرایند بیولوژیکی تقسیم می‌کند که در شکل ۳ مشاهده می‌شود. براساس نقشه ژنومیک حاصل متوجه می‌شویم بیشتر محتویات ژنومی جامعه میکروبی درگیر در رسیدگی پنیر صرف فرایندهای بیولوژیکی و واکنش‌های مولکولی شده است. از آنجایی‌که غالبا عملکردهای مولکولی به فعالیت‌های آنزیمی می‌پردازد که از دیدگاه میکروبی در رسیدگی پنیر، تغییرات بافت، طعم و مزه اهمیت دارد در اینجا به آنزیم‌های حاصل از محتوای ژنومی این جامعه میکروبی می‌پردازیم (شکل ۴).

1 Mapping
2 Gene Ontology ID

مطابق شکل ۴ (a و b) بخش بزرگی از عملکرد مولکولی فلور میکروبی پنیر مورد مطالعه به موارد زیر اختصاص دارد که مرتبط به رونویسی از ژن‌ها، مصرف انرژی طی فرایند باز شدن رشته‌های RNA و DNA جهت رونویسی و نسخه‌برداری، فسفوریلاسیون کربوهیدرات‌ها و انتقال گروه متیل بین ترکیبات شیمیایی است. همچنین براساس نتایج تجزیه و تحلیل سرور KAAS پروتئین‌های شناخته شده مرتبط با متابولیسم در پنیر سنتی مورد مطالعه ما شامل کینازها، فسفاتاز، پپتیدازها، گلیکوزیل ترانسفرازها، فنیل ترانسفرازها، آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم اسیدهای آمینه و پروتئین‌های مرتبط با بیوسنتز لیپوپلی‌ساکاریدها، چربی‌ها، پلی‌کتیدها و همچنین بیوسنتز و تجزیه پپتید و گلیکان‌ها می‌باشد. در جدول ۱ محتوای ژنومی مسئول بیان آنزیمی، مسیرها و متابولیت‌های حاصل از واکنش‌های آنزیمی در رسیدگی سطحی پنیر مشخص شده است.

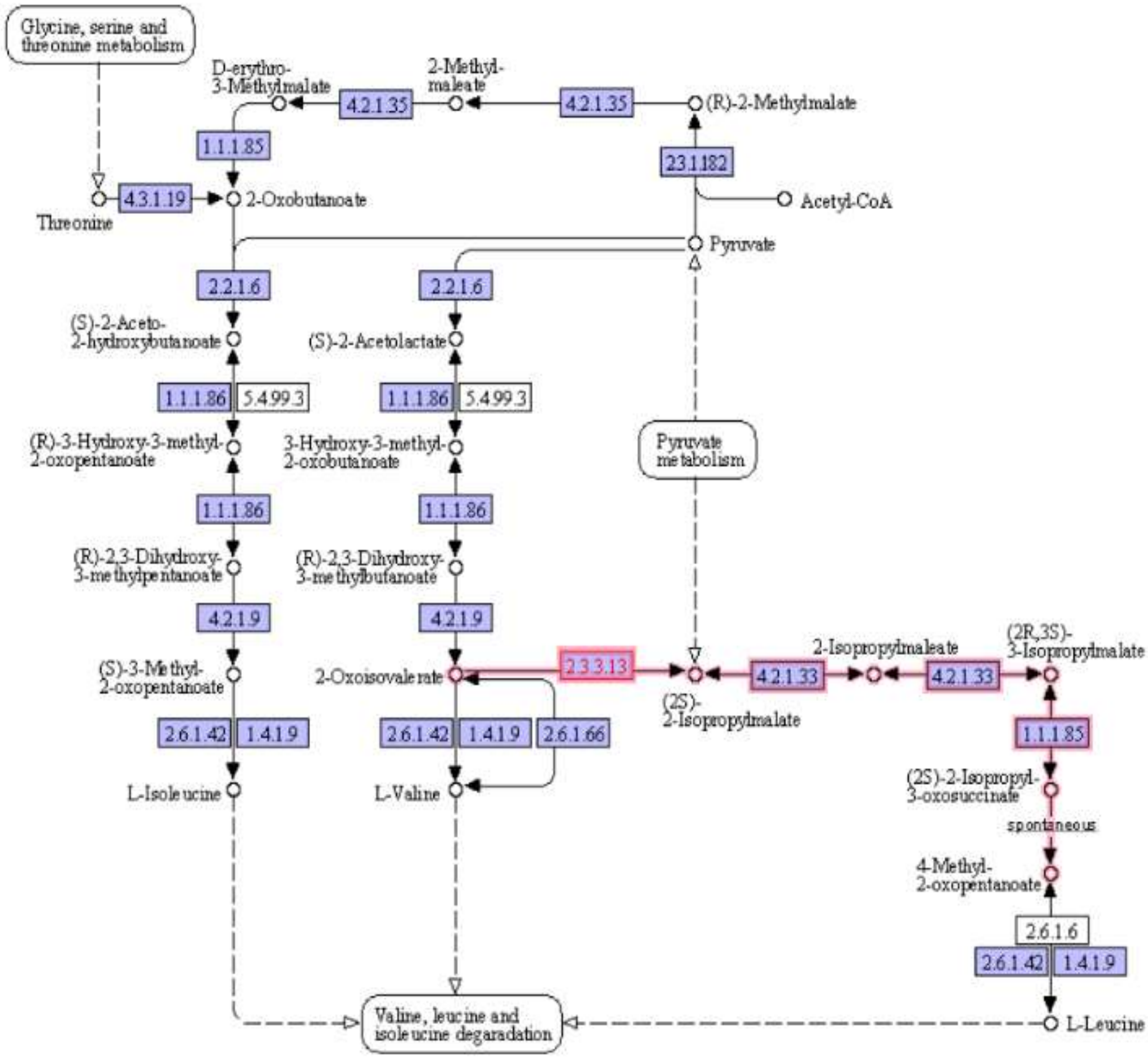
**جدول ۱- محتوای آنزیمی، مسیرها و متابولیت‌های حاصل از واکنش‌های آنزیمی در رسیدگی لایه سطحی پنیر**

| | آنزیم | EC | مسیر متابولیکی |
|---|---|---|---|
| Transferase | 1,3-β-D-glucan synthase | EC 2.4.1.34 | متابولیسم ساکاروز و نشاسته- بیوسنتز ۱،۳-بتا- دی گلوکان |
| | 2-isopropylmalate synthase | EC 2.3.3.13 | بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه- متابولیسم پیروات، والین، لوسین، ایزولوسین و ۳- متیل بوتانول |
| | 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase | EC 2.1.2.11 | بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، پانتوتنات ، CoA و فسفوپانتوتنات |
| | 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase | EC 2.3.1.41 | بیوسنتز آراشیدونات، پالمیتات، اسید چرب، گندوآت، پالمیتات، استئارات، مسیر عالی در شروع بیوسنتز اسیدهای چرب |
| | 4-alpha-glucanotransferase | EC 2.4.1.25 | متابولیسم گلیکوژن، نشاسته و ساکاروز |
| | 6-phosphofructokinase | EC 2.7.1.11 | متابولیسم گالاکتوز، متان، فروکتوز و مانوز، مسیر پنتوز فسفات- بیوسنتز ۱،۳- پروپان دی اول |
| | aminoglycoside 3-*N*-acetyltransferase | EC 2.3.1.81 | |
| | thymidine kinase | EC 2.7.1.21 | متابولیسم داروها و پیریمیدین |
| Lyases | 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase | EC 4.6.1.12 | بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، ایزوپرنوئید، متابولیت‌های ثانویه، ترپنوئید |
| | 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase | EC 4.1.99.12 | بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و فلاوین |
| | 3-dehydroquinate dehydratase | EC 4.2.1.10 | بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، متابولیت‌های ثانویه، فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان |
| Hydrolases | 3'-5' DNA helicase | EC 3.6.4.12 | |
| | 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase | EC 3.1.2.4 | بیوسنتز بتا- آلانین، والین، آلانین- متابولیسم پروپانوآت |
| | fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase | EC 3.1.3.11 | بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه- متابولیسم متان، فروکتوز و مانوز- مسیر پنتوز فسفات |
| | serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase | EC 3.4.16.4 | بیوسنتز پپتیدوگلیکان |
| Oxidoreductases | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase | EC 1.1.1.35 | متابولیسم تریپتوفان، چربی و بوتانوآت- بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، متابولیت‌های ثانویه و ۳- هیدروکسی بوتانوآت |
| | 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase | EC 1.17.7.4 | بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، ایزوپرنوئیدها، متابولیت‌های ثانویه و ترپنوئیدها |
| | 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase | EC 1.17.1.8 | بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها، مونوباکتوم، متابولیت‌های ثانویه و ال- لیزین |
| Isomerases | 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino) uracil reductase | EC 1.1.1.193 | بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، توکسوفلاوین، فلاوین |
| | 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase | EC 5.3.3.10 | متابولیسم تیروزین |

بر اساس این جدول واکنش‌های آنزیمی زیادی که در لیپولیز و پروتئولیز موثر در تشکیل طعم و آروما نقش دارند شناسایی شده است. از آن‌جمله می‌توان به آنزیم‌هایی شرکت کننده در متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای آمینه به شرح زیر اشاره کرد. 4-hydroxy-

tetrahydrodipicolinate reductase, 2-isopropylmalate synthase, 3-dehydroquinate dehydratase, 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase.

*L. lactis* به‌عنوان یکی از باکتری‌های مهم در رسیدگی پنیر مورد مطالعه ما، قادر به تولید تمام اسیدهای آمینه نبوده ولی قادر به جذب اسیدهای آمینه ضروری کوچک از محیط می‌باشد. بیشتر اسیدهای آمینه در ابتدا توسط ترانس آمینازها به اسیدهای آلفا-کتو مربوطه تبدیل می‌شوند که این اسیدها واسطه‌های مرکزی هستند و می‌توانند به اسیدهای هیدروکسی، آلدئیدها و CoA-استرها تبدیل شوند. این واکنش‌ها بیشتر آنزیمی هستند، اما برخی از مراحل توسط واکنش‌های شیمیایی نظیر تشکیل بنزآلدئید از اسید فنیل پیرویک نیز اتفاق می‌افتد. در مطالعه ما محتوای ژنومی مسئول بیان آنزیم 2-isopropylmalate synthase (EC 2.3.3.13) از دسته ترانسفرازها که در بیوسنتز اسیدهای آمینه شاخه‌دار والین، لوسین و ایزولوسین مطابق شکل ۵ نقش دارد شناسایی شد.




**شکل ۵- نقش آنزیم 2-isopropylmalate synthase; EC 2.3.3.13 در بیوسنتز لوسین، ایزولوسین و والین برگرفته از KAAS**

یکی از مسیرهای بیولوژیکی تجزیه کننده اسیدهای آمینه، تولید پیش‌سازهایی است که می‌تواند در سنتز برخی مواد نظیر اسیدهای چرب استرول و زنجیره‌دار استفاده شود. همچنین هیدروژنه شدن آلفا-کتو می‌تواند به افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیاء NADH کمک کند (Smit *et al.*, 2005). تبدیل اسیدهای آمینه به الکل از طریق اسیدهای آلفا-کتو در ابتدا برای تشکیل الکل‌های فوزل[1] (الکل‌های

1 Fusel alcohols

زنجیره کوتاه منشعب) در مخمر شناخته شد که به آن مسیر ارلیچ گفته می‌شود. یکی دیگر از مسیرهای مهم تبدیل اسیدهای آمینه توسط لیازها مانند سیستاتیونین b-Lyase انجام می‌شود که قادر به تبدیل متیونین به متانیتول است. ترئونین آلدولاز (EC 4.1.2.5) متعلق به طبقه دیگری از لیازها است که قادر به تبدیل مستقیم ترئونین به استالدئید می‌باشد. سومین مسیر تبدیل اسیدهای آمینه، دکربوکسیلاسیون آن‌ها به آمین‌هاست که این واکنش، با توجه به ضرر آمین‌های بیوژن برای سلامت انسان مورد اهمیت است ( Marilley and Casey, 2004; Smit *et al*., 2005). در مطالعه حاضر نیز محتوای ژنومی مسئول بیان آنزیم 3-dehydroquinate dehydratase (EC 4.2.1.10) از گروه لیازها که در سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین مهم است مطابق شکل ۶ شناسایی شده است.

در سلول‌های میکروبی جذب پپتید از طریق سیستم‌های حمل و نقل الیگوپپتید (سیستم OPP) و دی/ تری پپتید اتفاق می‌افتد. پس از جذب، پپتیدها به واسطه انواع پپتیدازهای درون سلولی تجزیه می‌شوند. پپتیدازهای شناخته شده در باکتری‌های اسید لاکتیک را می‌توان به آندوپپتیدازها، آمینوپپتیدازها، دی/ تری پپتیدازها و پپتیدازهای خاص پرولین تقسیم‌بندی کرد. اگرچه پپتیدها و اسیدهای آمینه حاصل می‌توانند باعث طعم شیرین، تلخ و یا شور در محصول شوند، اما به‌طور کلی آن‌ها فقط به تشدید طعم اصلی پنیر کمک می‌کنند. با این حال، پروتئولیز نامتوازن ممکن است به تولید بیش از حد پپتیدهای تلخ منجر شود که می‌تواند باعث کاهش مقبولیت خواص حسی نظیر عطر و طعم در پنیر شود (Marilley and Casey, 2004; Smit *et al*., 2005).

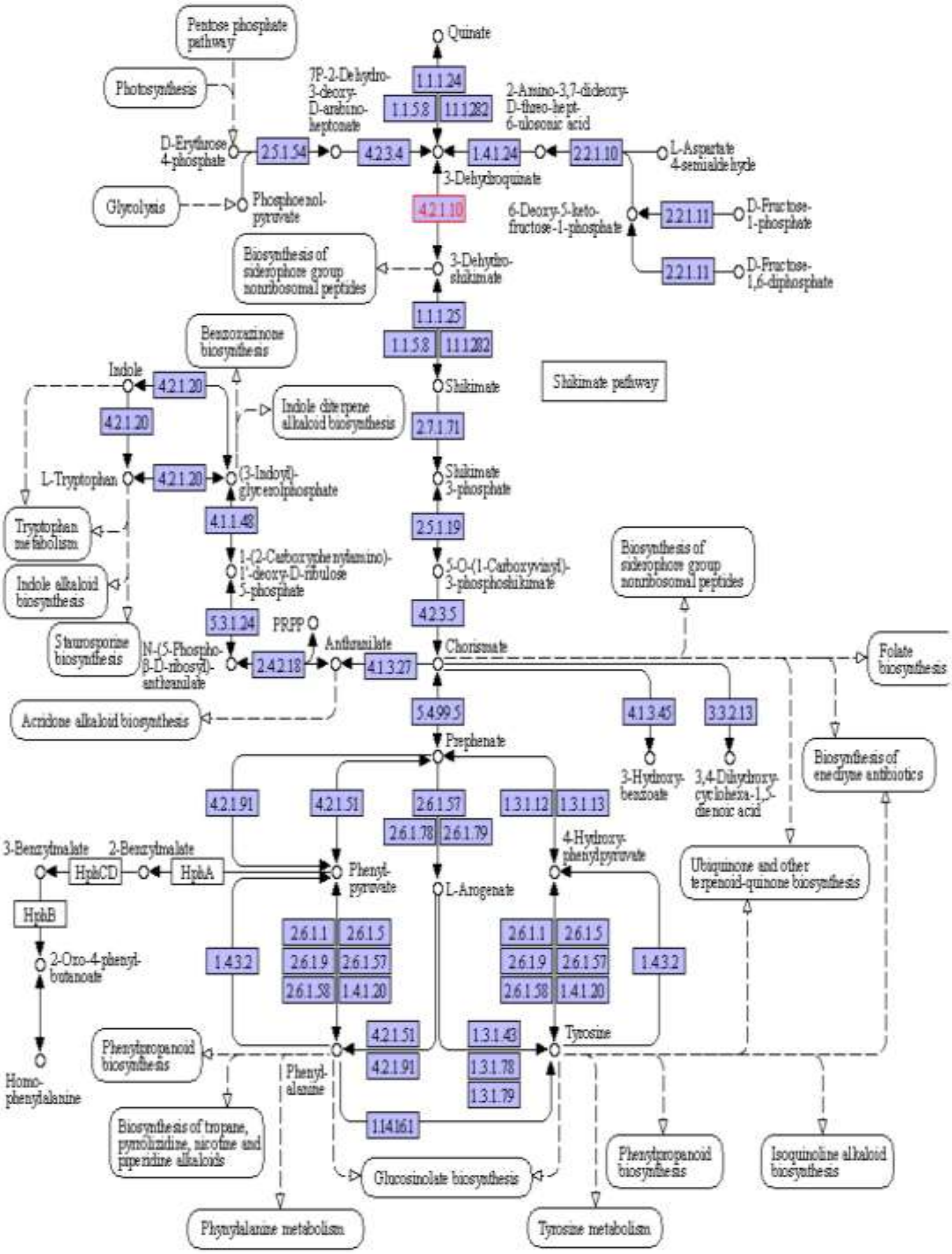
از جمله پپتیدازهای شناخته شده در مطالعه ما serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (EC 3.4.16.4) و 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.4) است که در متابولیسم اسیدهای آمینه نقش دارند. متیونال، ۳-متیل بوتان، اسید ایزووالریک و بنزآلدئید نمونه‌هایی ازترکیبات اصلی طعم‌دهنده هستند که توسط ترانس آمینازها (آمینوترانسفرازها) تولید می‌شوند. این نوع آنزیم به‌طور گسترده در بین میکروارگانیسم‌ها توزیع شده و از پیریدوکسال-۵-فسفات به‌عنوان کوفاکتور برای کاتالیز استفاده می‌کند. در اولین مرحله از کاتابولیسم اسیدهای آمینه، ترانس آمینازها تبدیل اسیدآمینه به اسید آلفا-کتو مربوطه را کاتالیز می‌کنند. برای تبدیل انواع مختلفی از اسیدهای آمینه مانند نوع زنجیره‌ای منشعب BcAA و نوع آروماتیک ArAA، ترانس آمینازهای خاصی شناسایی شده‌اند (Marilley and Casey, 2004; Smit *et al*., 2005).

Marilley وCasey (۲۰۰۴)، نقش احتمالی کاتابولیسم اسیدهای آمینه را در تولید ترکیبات عطر و طعم توسط تکنیک‌های مختلف نظیر شناسایی ژنوتیپ، تجزیه و تحلیل آنزیمی، فیزیکی و شیمیایی ( GC, TLC, HPLC و بینی الکترونیکی) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش، نقش اسیدهای آمینه و اسیدهای کتو در تولید ترکیبات عطر و طعم را تایید کرد. استرها حاصل واکنش بین الکل‌ها و اسیدهای آلی می‌باشند و ممکن است با اتصال به CoA فعال شوند. علاوه بر ترکیبات حاصل از متابولیسم اسیدهای آمینه، استرها (مانند اتیل بوتیرات) نیز در عطر و طعم پنیر چدار نقش دارند. متابولیسم قند و چربی، بسترهای لازم برای تشکیل استر را فراهم می‌کند. استرازها و لیپازها، هیدولازهای سرینی هستند که بسته به شرایط محیطی می‌توانند منجر به سنتز یا هیدرولیز استرها شوند، در حالی که استیل ترانسفرازها فقط سنتز استر را کاتالیز می‌کنند. استری شدن به شدت به پارامترهای محیطی مانند فعالیت آبی بستگی دارد ( Smit *et al*., 2005). کربوکسیلازها با دکربوکسیلاسیون اسیدهای کتو بدون شاخه منجر به تولید آلدئیدهایی با طعم شور یا شیرین با آستانه بویایی کم می‌شوند. ۳-متیل بوتیریک اسید به‌عنوان ترکیب مولد عطر و طعم که با اکسیداسیون بعدی آلدئید می‌تواند تولید شود، در بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک یافت شده است. اکسیداسیون آلدئیدهای زنجیره‌ای منشعب توسط آلدئید دهیدروزناز منجر به تولید اسیدهای آلی زنجیره‌ای متناوب می‌شود. در مطالعه ما از دسته دهیدروژنازها، آنزیم 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.35) شناسایی شد که در بیوسنتز S&R-۳-هیدروکسی بوتانوآت، متابولسیم تریپتوفان، چربی‌ها وبوتانوآت، تجزیه لایزین، لوسین، ایزولوسین، والین و تثبیت کربن نقش دارد. یک کمپلکس اسیدکتودهیدروژناز حاصل ترکیب دکربوکسیلاز با آلدئید دهیدروژناز در باکتری‌های اسید لاکتیک وجود دارد که قادر است اسید آلفا-کتو را مستقیما به اسید آلی مربوطه تبدیل کند. این مجموعه آنزیمی دهیدروژناز کاملا با پیروات دهیدروژناز متفاوت است و از سه مولفه کاتالیزوری تشکیل شده است که شامل اسیدکتودهیدروژناز، دی هیدرولیپویل ترانسیلاز[1]و لیپامید دهیدروژناز[2] است. دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو اسیدهای آلفا-کتو توسط این مجموعه آنزیمی در باکتری‌های اسید لاکتیک برای تشکیل عطر و طعم مهم است؛ زیرا اسیدهای کربوکسیلیک مانند اسید ایزووالریک از اسیدهای مهم طعم دهنده هستند. علاوه بر این از جمله ترکیبات پیش‌ساز عطر و طعم از گروه اسیدهای کربوکسیلیک می‌توان استرها، تیو استرها، کرزول و اسکاتول را نیز نام برد (Smit *et al*., 2005).

در مطالعه ما آنزیم‌های دخیل در متابولیسم و بیوسنتز اسیدهای چرب شامل 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase و -3

1 Dihydrolipoyl transacylase
2 Lipoamide dehydrogenase

oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (EC 2.3.1.41) نیز شناسایی گردید.




**شکل ٦– نقش آنزیم 3-dehydroquinate dehydratase; EC 4.2.1.10 در بیوسنتز تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین برگرفته از KAAS**

از آنزیم‌های مهم دیگر شناسایی شده در مسیرهای متابولیکی پنیر مورد مطالعه ما که می‌تواند در تولید طعم و بو موثر باشند شامل fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase (EC 3.1.3.11) موثر در مسیر پنتوز فسفات (تخمیر هترولاکتیکی)، متابولیسم متان،

مانوز و فروکتوز و 6-phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) موثر در متابولیسم فروکتوز، متان، گالاکتوز و مانوز می‌باشد.

به‌علاوه شناسایی آنزیم‌های thymidine kinase (EC 2.7.1.21) که در تولید پیریمیدین و داروها نقش دارد، aminoglycoside 3-*N*-acetyltransferase (EC 2.3.1.81) موثر در سنتز Kanamycin و N-acetylneamine و سایر آنزیم‌های دخیل در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه که در جدول ۱ مشخص شده است نشان می‌دهد که ترکیبات با ارزش دارویی و آنتی بیوتیک‌ها نیز در این محصول تولید شده است که مسئولیت تولید آن می‌تواند بر عهده قارچ‌های موجود در محیط رسیدگی پنیر باشد که شناسایی آن‌ها هدف این مطالعه نبوده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که این پنیر سنتی دارای ارزش غذایی و دارویی می‌باشد. قبلا نیز مطالعاتی در زمینه خواص دارویی و درمانی پنیرهای مشابه آن نظیر چدار انجام شده است که می‌توان به مطالعه Pritchard و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد آن‌ها توانستند پپتیدهای بیواکتیو با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدفشار خون و فعالیت ضدمیکروبی علیه *Bacillus cereus* را در پنیر چدار شناسایی کنند.

Aparna و همکاران (۲۰۱۰) نیز توانستند پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی تولید شده توسط *Lactobacillus casei* ssp. *casei* را در پنیر چدار شناسایی کنند. پروتئولیز به دلیل هیدولیز پارا–کازئین پنیر و افزایش ظرفیت اتصال آب به واسطه تولید گروه‌های جدید آلفا–کربوکسیلیک و آلفا–آمینو و به‌طور غیرمستقیم با افزایش pH از طریق تولید $NH_3$ ناشی از کاتابولیسم اسیدهای آمینه آزاد نقش مهمی در ایجاد بافت پنیر دارد. توسعه بافت در طی رسیدن پنیر به دو مرحله تقسیم می‌شود. فاز اول در هفته‌های اول رسیدن (حدودا ۲ تا ۴ هفته) اتفاق می‌افتد و شامل تبدیل بافت لاستیکی پنیر تازه وجوان به یک بافت نرم و یکنواخت‌تر است؛ که با تضعیف پارا–کازئین دلمه همراه است. فاز دوم در زمان باقی‌مانده تا رسیدن کامل رخ می‌دهد و شامل تغییرات تدریجی‌تر در بافت مانند تغییر در pH، ادامه پروتئولیز و تغییر در هیدراتاسیون پروتئین می‌باشد.

هیدرولیز متوسط کیموزین با واسطه $\alpha s_1$-casein در Phe23-Phe24 مسئول نرم شدن بافت در فاز اول می‌باشد. ناحیه N ترمینال مولکول $\alpha s_1$-casein به شدت آبگریز است و هیدرولیز آن در Phe23-Phe24 موجب کاهش آبگریزی سطح این مولکول می‌شود. تصور می‌شود از بین رفتن محل تعامل آبگریز در سطح $\alpha s_1$-casein مسئول نرم شدن بافت پنیر چدار است. نرم شدن پنیر کاممبرت در حین رسیدن، با رشد *Penicillium Comemberti* همراه با متابولیسم لاکتات در سطح پنیر رخ می‌دهد. درنتیجه باعث کاهش لاکتات و ایجاد گرادیان pH از سطح به سمت مرکز حاوی اسید بیشتر می‌شود. سپس در حین رسیدن، $NH_3$ حاصله از اسیدهای آمینه آزاد سطح پنیر را خنثی می‌کند. کاهش غلظت لاکتات در سطح در اثر متابولیسم آن، موجب مهاجرت لاکتات از مرکز به سطح می‌شود. از طرفی غلظت کلسیم فسفات در فاز آبی سطح پنیر بیشتر از محلول آن است و به‌عنوان لایه کلسیم فسفات رسوب می‌کند که سبب گرادیان فسفات کلسیم از سطح به مرکز پنیر می‌شود. افزایش pH در سطح پنیر به pH بهینه فعالیت آنزیم پلاسمین نزدیک می‌شود. پلاسمین و کیموزین اساسا مسئول پروتئولیز اولیه کازئین‌ها در پنیرهای کاممبرت هستند. ترکیبی از pH بالا، از دست دادن کلسیم و میزان کمتر پروتئولیز ماتریس کازئین باعث نرم شدن قابل توجه نمونه‌های پنیر کاممبرت می‌شود که در انتهای رسیدن تقریبا مایع می‌شوند (McSweeney *et al*., 2006). در مطالعه ما از محتوای ژنومی شناخته شده، فعالیت پروتئازی که قبلا نقش آن در تغییر بافت گزارش شده باشد شناسایی نشد و تغییر بافت پنیر احتمالا به دلیل تغییرات pH و تجزیه ترکیبات آلی حاصل از فعالیت میکروبی می‌باشد. متاژنومیکس کمک شایانی به محققین در شناخت تغییرات میکروبی در طی رسیدگی پنیر کرده است. از جمله می‌توان به مطالعه Lordan و همکاران (۲۰۱۹) اشاره کرد. آن‌ها در مطالعه خود طبق تجزیه و تحیل داده‌های حاصل از متاژنومیکس اعلام کردند که *L. lactis* از ظرفیت ژنتیکی مناسبی برای بیوسنتز لیپیدهای قطبی و اسیدهای چرب برخوردار است که در طی تخمیر این ظرفیت افزایش یافت و براساس تجزیه و تحلیل GOهای به‌دست آمده از این تحقیق، *L. lactis* به‌عنوان فلور غالب فعالیت‌های عملکردی زیر را در طی رسیدگی پنیر حاصل از شیر بز نشان داد: Biotin carboxylase activity, biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase activity, lipid metabolic process, fatty acid biosynthetic process, glycerophospholipid metabolic process, lipid biosynthetic process, phospholipid biosynthetic process, cardiolipin synthase activity, cardiolipin biosynthetic process.

همچنین چندین عملکرد مولکولی مهم برای بیوسنتز لیپیدهای قطبی نیز به شرح زیر در این مطالعه شناسایی گردید: CTP synthase activity, CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase activity, CDP-diacylglycerol biosynthetic process, glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase activity, CDP-glycerol glycerophosphotransferase activity.

آن‌ها چندین دسته آنزیم مسئول بیوسنتز اسیدهای چرب مانند استیل CoA کربوکسیلاز (EC 6.4.1.2) و مختص بیوسنتز فسفولیپیدها که منبع اصلی آن *L. lactis* بود به شرح زیر گزارش کردند (Lordan *et al*., 2019): glycerol-3-phosphate acyl-transferase (EC 2.3.1.n3), glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase (EC 2.7.7.41), CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5).

در مطالعه‌ای مشابه تحقیق ما، Duru و همکاران (۲۰۱۸) بر روی تجزیه و تحلیل متاژنومیکس جامعه میکروبی نوعی پنیر سوئیسی نشان دادند که فلور میکروبی غالب در طی رسیدگی پنیر را *L. lactis* ،

*P. freudenreichii*، *L. helveticus* و *Lactobacillus rhamnosus* تشکیل می‌دهد و طعم آجیلی و شیرین درطی رسیدگی پنیر به‌واسطه فعالیت‌های متابولیکی میکروبیوتای این پنیر توسعه می‌یابد. همچنین از نگاشت ژنومی در این مطالعه مشخص شد که پتانسیل برای مسیرهای تشکیل طعم‌های متعدد نظیر اسیدهای چرب آزاد، استوئین، دی استیل، استات، اتانول، تخمیر هومولاکتیکی، متان تیول، بیوسنتز ویتامین‌ها و پروپیونات وجود دارد. مشابه مطالعه ما *L. lactis* بیشترین سهم این جامعه میکروبی (حدود ۸۰-۹۰٪) راتشکیل می‌داد. در مطالعه ما هم تخمیر هترولاکتیکی و مسیر پنتوز فسفات که در تولید استالدئید و اتانول به‌عنوان ترکیبات موثر در طعم پنیر نقش دارند شناسایی شدند.

Escobar-Zepeda و همکاران (۲۰۱۶) در تجزیه و تحلیل متاژنوم یک پنیر مکزیکی تهیه شده به طریق سنتی و تخمیر خودبه‌خودی از شیر خام گاو نشان دادند که توازن بین جمعیت میکروبی و پتانسیل متابولیکی آن باعث ایجاد خصوصیات حسی و ایمنی آن می‌شود. این جمعیت میکروبی از Lactobacillus , Leuconostoc , Weissella تشکیل می شد. مشابه نتایج حضور میکروبیوم این پنیر توانایی متابولیکی در بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات مولد عطر و طعم که اساسا با متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه دار و اسیدهای چرب در ارتباط بود را آشکار کرد ولی برخلاف مطالعه ما هیچ گونه باکتری پاتوژنی شناسایی نشد. همچنین ژن‌های مرتبط با تولید باکتریوسین نیز شناسایی گردید.

Bertuzzi و همکاران (۲۰۱۸) توسعه طعم و توالی میکروبی را در رسیدگی سطحی پنیر چدار توسط دو مخلوط کشت متشکل از باکتری و مخمر به کمک اومیکس بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که برخی گونه‌های تلقیح شده در طی رسیدگی بطور موفقیت آمیزی تثبیت شدند اما برخی دیگر که تلقیح شده بودند در طی رسیدگی شناسایی نشدند و *G. arilaitensis* به‌عنوان غالب‌ترین گونه باکتریایی شناخته شد که جزئی از مخلوط کشت اولیه نبود. همچنین مخمرهای *Debaryomyces hansenii* و *Geotrichum candidum* که در طی فاز اولیه رسیدگی شناسایی شده بودند در فاز انتهایی توسط *Brevibacterium linens* و *G. arilaitensis* مغلوب شده بودند. و تجزیه و تحلیل متاژنوم نشان داد که جامعه میکروبی پتانسیل عملکردی در توسعه طعم، تغییر رنگ و pH دارد.

در مطالعه ما نیز به طور مشابهی *G. arilaitensis* در رسیدگی پنیر شناسایی شد که در تحقیقات قبلی، عمدتا برپایه شناسایی وابسته به کشت، حضور این باکتری در رسیدگی انواع پنیرها کمتر به چشم می‌خورد. احتمالا رشد این باکتری روی محیط کشت جامد ضعیف بوده و کلنی آن به طور ضعیفی قابل استحصال است و این نشان می‌دهد که تجزیه و تحلیل متاژنومیکس به‌عنوان یک ابزار قدرتمند مستقل از کشت در شناسایی میکروارگانیسم‌ها قدرت بالایی در تشخیص دقیق کل جامعه میکروبی دارد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه تجزیه و تحلیل متاژنومیکس بر روی یکی از پنیرهای سنتی ایران، فرصت خوبی را جهت شناسایی میکروبیوم این پنیر و ژن‌های مسئول رسیدگی آن فراهم کرد. با وجود اینکه براساس نتایج، محصول از فلور میکروبی متنوعی برخوردار بود ولی *S. thermophilus*، *L.lactis* و *L. helveticus* به‌عنوان فلور غالب مسئول اصلی رسیدگی این پنیر شناخته شدند. به دلیل فعالیت‌های ضدمیکروبی این فلور میکروبی غالب، حضور باکتری‌های بیماریزا با مقدار اندک احتمالا تهدیدی برای مصرف‌کنندگان این پنیر سنتی نخواهد داشت. تجزیه و تحلیل متاژنوم آشکار کرد محتوای ژنوم این پنیر از پتانسیل بالایی در متابولیسم اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه و در نتیجه توسعه عطر و طعم برخوردار است. همچنین حضور باکتری‌های پروبیوتیک و پتانسیل ژنومیک در تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات دارویی بر خواص سلامتی بخش و ارزش تغذیه‌ای این پنیر می‌افزاید. حضور محتوای ژنومیک منتسب به یوکاریوت‌ها در این تجزیه و تحلیل نشان‌گر فعالیت قارچ‌ها در طی رسیدگی این پنیر است که نیاز به تجزیه و تحلیل بیشتر نتایج و بررسی دقیق‌تر آن در مسیر تجزیه و تحلیل یوکاریوتی دارد.

## منابع

Aparna, G., Bimlesh, M., Rajesh, K., & Sangwan, R. B., 2010, Identification of antioxidant peptides in cheddar cheese made with adjunct culture Lactobacillus casei ssp. casei 300. *Milchwissenschaft*, 65(4), 396-399.

Ben Lawlor, J., Delahunty, C. M., Wilkinson, M. G., & Sheehan, J., 2003, Swiss-type and Swiss–Cheddar hybrid-type cheeses: effects of manufacture on sensory character and relationships between the sensory attributes and volatile compounds and gross compositional constituents. *International journal of dairy technology*, 56(1), 39-51.

Bertuzzi, A. S., Walsh, A. M., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., Crispie, F., McSweeney, P. L., & Rea, M. C., 2018, Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *MSystems*, 3(1).

Broadbent, J. R., Brighton, C., McMahon, D. J., Farkye, N. Y., Johnson, M. E., & Steele, J. L., 2013, Microbiology of Cheddar cheese made with different fat contents using a *Lactococcus lactis* single-strain starter. *Journal of dairy science*, 96(7), 4212-4222.

Cardinal, M. J., Meghrous, J., Lacroix, C., & Simard, R. E., 1997, Isolation of *Lactococcus lactis* strains producing inhibitory activity against Listeria. *Food Biotechnology*, 11(2), 129-146.

Duru, I. C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., & Smolander, O. P., 2018, Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International journal of food microbiology*, 281, 10-22.

Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., & Baruch, M. Q., 2016, Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food microbiology*, 57, 116-127.

Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S., & Beresford, T., 1999, Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3418-3426.

Ganesan, B., Weimer, B. C., Pinzon, J., Kong, N. D., Rompato, G., Brothersen, C., & McMahon, D. J., 2014, Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 116(6), 1642-1656.

Harrigan, W., 1998, Laboratory methods in food microbiology: Gulf Professional Publishing.

https://www.genome.jp/kegg/.

https://www.genome.jp/kegg/kaas/

Johnson, M. E., 2014, Mesophilic and thermophilic cultures used in traditional cheesemaking. *Cheese and Microbes*, 73-94.

Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., & Vergès, M. C. C., 2015, Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International journal of food microbiology*, 213, 31-39.

Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.), 2011, *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.

Liggett, R. E., Drake, M. A., & Delwiche, J. F., 2008, Impact of flavor attributes on consumer liking of Swiss cheese. *Journal of dairy science*, 91(2), 466-476.

Lordan, R., Walsh, A., Crispie, F., Finnegan, L., Demuru, M., Tsoupras, A., Zabetakis, I., 2019, Caprine milk fermentation enhances the antithrombotic properties of cheese polar lipids. *Journal of Functional Foods*, 61, 103507.

Marilley, L., & Casey, M. G., 2004, Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International journal of food microbiology*, 90(2), 139-159.

McSweeney, P. L. H., Hayaloglu, A. A., O'Mahony, J. A., & Bansal, N., 2006, Perspectives on cheese ripening. *Australian journal of dairy technology*, 61(2), 69.

Murtaza, M. A., Ur-Rehman, S., Anjum, F. M., Huma, N., & Hafiz, I., 2014, Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(10), 1309-1321.

Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K., 2010, Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43(5), 1545-1548.

Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J., 2005, Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 591-610.

Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J., 2005, Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 591-610.

Swearingen, P. A., O'sullivan, D. J., & Warthesen, J. J., 2001, Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 50-59.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 631-645

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۴۵-۶۳۱

# Metagenomic analysis of the microbial community in an Iranian local cheese

**N. Davati[1*], S. Bahrami[2]**

Received: 2020.07.26
Accepted: 2020.08.23

**Introduction:** The consumption of local and traditional dairy products have increased in recent years and some local cheeses as functional foods with desirable organoleptic attributes have positive effects on human health. However, there is concern that consumption of these products may increase the risk of exposure to food born bacteria such as Enterobacteriaceae family, *Staphylococcus aureus,* and *Listeria monocytogenes*. The microbiome of fermented products such as cheese is one of the most powerful and important parameters in flavor *development* and ripening. Furthermore, cheese *flavor* formation *as a* dynamic biochemical process *is* related to environmental conditions including milk source, *ripening* time, and temperature of storage. These parameters affect the microbial community structures and metabolic pathways.

**Materials and Methods:** In this study, a local cheese made from cow milk was prepared based on a local recipe. The traditional cheese was manufactured using mesophilic starter culture. The cheese was ripened at 10°C for 3 months. The samples were collected from the surface of the cheese. The serial dilution was performed until $10^{-10}$ dilution in sterile ringer. For isolation and phenotypic identification of lactic acid bacteria, a 100 µl of diluted sample was cultured on MRS agar and M17 agar, followed by incubation at 37°C for 48 h under anaerobic conditions with *Gas-Pak A*. After purification of colonies, the Gram-positive and catalase-negative *isolates were phenotypically identified* at genus level using physiological tests including capacity of gas production, growth at different pHs (9.6 and 4.4), salt tolerance (%6.5 and 18%), and different growth temperatures (10°C and 45°C). DNA extraction was performed with DNeasy®Blood & Tissue Kit. The microbial population of the cheese and its functional potential for ripening were investigated by whole-metagenome sequencing. The prepared library using Nextera™ DNA approach was sequenced by using the Illumina HiSeq® 2000, 2×100 bp paired- end reads. The metagenomics data of cheese microbiome were analyzed for taxonomic profiling and functional potential by De Novo Assemble Metagenome and Bin Pangenomes. The *metabolic pathways were* extracted from the *KEGG database.*

**Results and Discussion:** The results of phenotypic identification showed that most of the lactic acid bacteria strains belonged to Streptococcus, Lactococcus, and Lactobacillus. Also, the results of metagenomics analysis showed that there were various genera including Streptococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Acinetobacter, Enterococcus, Glutamicibacter, and Weissella in cheese. *Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis,* and *Lactobacillus helveticus* were identified as dominant species. Pathogenic bacteria such as Enterobacter, Listeria, and Staphylococcus were also slightly found and therefore there is nearly no concern for *consumers and human health*. The microbiome of this cheese showed the metabolic potential for the biosynthesis of a wide range of aroma compounds and associated with flavor development that related with the metabolism and biosynthesis of methane, branched chain amino acids (isoleucine, valine, and leucine), aromatic amino acids (tyrosine, tryptophan, and phenylalanine), other amino acids (beta-alanine, L-lysine), fatty acids (arachidonate, palmitate, stearate), and monosaccharides. The enzymes related to biosynthesis and metabolism of amino acids were found during ripening of this cheese. These enzymes included 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase, 2-isopropylmalate synthase, 3-dehydroquinate dehydratase, 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase, and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. Based on the results of KAAS (KEGG Automatic Annotation Server), proteins involved in metabolic pathways of microbial community on the surface of the traditional cheese included Cytochrome P450 Photosynthesis Proteins, Peptidases & Inhibitors, Glycosyltransferases, Lipopolysaccharide Biosynthesis Proteins, Peptidoglycan Biosynthesis and Degradation Proteins, Lipid Biosynthesis Proteins, Protein Kinases, Polyketide Biosynthesis Proteins Prenyltransferases, Protein Phosphatases & Associated Proteins, and Amino Acid Related Enzymes. The cheese under our study as a functional food showed health benefits for consumers due to the presence of probiotic bacteria and genes encoded for biosynthesis of valuable compounds including antibiotics, drugs, and antioxidants.

**Keywords**: Cheese, Metagenomic, Flavor, Lactic acid bacteria.

1 Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2. MSc Student, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
(*Corresponding Author Email: n.davati@basu.ac.ir)